

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EPO-BERLIN

06-07-2004

EP04/6534

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 28 813.9

Anmeldetag:

20. Juni 2003

Anmelder/Inhaber:

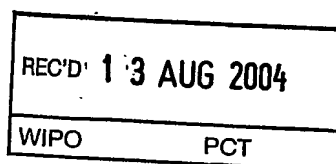
Epigenomics AG,
10435 Berlin/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-
Methylierungen in DNA-Sequenzen mittels
triplexbildender Oligomere

IPC:

C 12 Q 1/68



Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 01. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Remus

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-Sequenzen mittels triplexbildender Oligomere

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-Sequenzen. Es werden triplexbildende Oligomere eingesetzt, die bevorzugt an den Positionen Triplex-Strukturen ausbilden, an denen Cytosin in der Position 5 unmethyliert vorliegt. Die Triplexe blockieren die Transkription, Replikation und Amplifikation der DNA. Als triplexbildende Oligomere können insbesondere Peptid-Nukleinsäure-Oligomere mit modifizierten Nukleobasen verwendet werden.

15

Hintergrund der Erfindung

20

25

30

35

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek, eds.: The Epigenome. Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die gebräuchlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (Bisulfit-Behandlung). Die enzymatisch oder chemisch vor-behandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff).

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine direkte Methylierungsanalyse in der Ziel-DNA ohne vorgeschaltete enzymatische oder chemische Vorbehandlung und ist damit schneller und einfacher als die konventionelle Methodik. Erfindungsgemäß werden Oligomere eingesetzt, die sequenzspezifisch an die DNA binden und dort Triplexstrukturen formen. Die Bindung erfolgt bevorzugt an den Positionen, an denen Cytosin unmethyliert vorliegt, was überwiegend auf sterische Einflüsse der Methylgruppe des 5-Methylcytosins zurückzuführen ist. Der Nachweis der Triplexbildung und damit des Methylierungsstatus kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. So ist es möglich, die nicht-methylierten Positionen direkt durch Einsatz markierter triplexbildender Oligomere nachzuweisen. Die Detektion einer Methylierung kann über eine Amplifikation der methylierten DNA erfolgen, während gleichzeitig die Amplifikation unmethylierter DNA durch die Triplexstruktur blockiert wird.

Die Erfindung nutzt die Erkenntnis, dass DNA unter bestimmten Umständen in einer Triplex-Struktur auftreten kann. Begünstigt wird die Triplex-Bildung durch eine Homopurin-Homopyridin-Sequenz im DNA-Doppelstrang. In die große Furche des Doppelstranges kann sich dann sequenzspezifisch ein dritter DNA-Strang anlagern, wobei es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Homo-

purin-Sequenz kommt. Abhängig von der relativen Orientierung des dritten Stranges zum Purin-Strang treten zwei unterschiedliche Triplex-Strukturen auf. Im sog. Pyrimidin-Motiv ist der dritte Strang reich an Pyrimidin (Y) und bindet parallel zum Purin (R)-Strang der Doppelhelix (Y-RY-Motiv). Dabei werden jeweils zwei Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thymin und Adenin (T-AT) sowie zwischen protoniertem Cytosin und Guanin (C^+ -GC) ausgebildet. Die Y-RY-Triplexe sind nur unter acidischen Bedingungen stabil. Im Purin-Motiv bindet ein Purin-reicher dritter Strang anti-parallel zu dem Purin-Strang der Duplex (R-RY). Es kommt zu zwei reversen Hoogsteen Basenpaarungen zwischen Guanin und Guanin (G-GC), Adenin und Adenin (A-AT) bzw. Thymin und Adenin (T-AT). Die Purin-Struktur ist pH-unabhängig und stabiler als das Pyrimidin-Motiv. Die Bildung beider Typen von Triplexen ist abhängig von Kettenlänge, Basenzusammensetzung, Konzentration divalenter Kationen und Temperatur (zur Übersicht: Guntaka et al.: Triplex-forming oligonucleotides as modulators of gene expression. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Jan; 35 (1): 22-31).

Da es zur Triplexbildung erforderlich ist, dass der dritte Strang mit einer Homopurin-Sequenz im Doppelstrang in Wechselwirkung tritt, können grundsätzlich nur GC- und AT-, nicht aber CG- und TA-Basenpaare im Doppelstrang erkannt werden. Pro Fehlpaarung wird die Triplex um etwa 2,5- 4,0 Kcal/mol destabilisiert; die Stabilität der Triplexbildung verringert sich um einen Faktor von 10-100 oder mehr (Vasquez and Wilson: Triplex-directed modification of genes and gene activity. Trends Biochem Sci. 1998 Jan; 23 (1): 4-9 1998 S. 4, 5). In der letzten Zeit gab es verschiedene Ansätze, den Triplex-Erkennungscode auch auf die anderen beiden Watson-Crick-Basenpaare auszudehnen. Die vielversprechendsten Kombinationen sind G-TA und T-CG. Dabei kann T-CG sowohl in einer parallelen wie in

einer antiparallelen Struktur vorkommen, während G-TA nur in paralleler Form auftritt (zur Übersicht: Gowers and Fox: Towards mixed sequence recognition by triple helix formation. *Nucleic Acids Res.* 1999 Apr 1; 27 (7): 1569-77.) Allerdings sind auch diese Triplexe weniger stabil als die kanonischen YRY-Triplexe. Ein Grund hierfür liegt darin, dass es zwischen T-CG und G-TA jeweils nur zur Ausbildung einer einzigen Wasserstoffbrückenbindung kommt, die kanonischen Triaden aber durch zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Zudem scheinen die Basen-Stapelungs-Wechselwirkungen über lange Entfernungen destabilisiert zu sein (zur Übersicht: Coman and Russu: Site-resolved energetics in DNA triple helices containing G*TA and T*CG triads. *Biochemistry.* 2002 Apr 2; 41 (13): 4407-14, mit weiteren Nachweisen).

In der Vergangenheit ist es mehrfach gelungen, eine Pyrimidinerkennung im Doppelstrang durch chemische Modifikation der Basen des Triplexstranges zu erreichen. Für eine Cytosin-Erkennung innerhalb paralleler Triplexe eignen sich insbesondere N4-substituierte Cytosin-Derivate mit Seitenketten, die Wasserstoffbrücken auch zu Guanin ausbilden können (zur Übersicht: Gowers and Fox 1999, a.a.o. S. 1573 mit weiteren Nachweisen; Vasquez and Glasser: Triplex-forming oligonucleotides: principles and applications. *Q. Rev. Biophys.* 2002 Feb; 35 (1): 89 ff, 98). Besonders geeignet sind N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin und N4-(6 Amino-2-pyridinyl)cytosin (Fig.1 und 2).

Neben veränderten Basen wurden eine Vielzahl von Modifikationen des dritten Strangs entwickelt, um Triplexe zu stabilisieren und ihre Degradation in Zellen und Geweben zu verringern. So wurden bei den eingesetzten Triplexbildenden Oligonukleotiden die Phosphoratome im Phosphatrückgrat durch Schwefel ersetzt, die OH-Gruppen in der Ribose und den Purin-Ringen methyliert oder die 5' und 3'

Enden mit unterschiedlichen Komponenten blockiert (zur Übersicht: Guntaka et al. 2003, a.a.o. S.23 mit weiteren Nachweisen). Auch andere Triplex-bildende Moleküle werden verwendet, insbesondere Peptidnukleinsäuren (Peptide Nucleic Acids PNA). Interessant ist dabei, dass sehr stabile Triplexe aus triplexbildenden PNAs mit DNA-PNA-Duplexen gebildet werden können (PNA₂-DNA-Triplexe, zur Übersicht: Ray and Norden: Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. FASEB J. 2000 Jun; 14 (9): 1041 ff, 1048).

Die Triplexbildung ist Grundlage mehrerer medizinisch-biologischer Anwendungen, etwa zur Transkriptionsmodulation, zur ortsgerichteten Mutagenese, zur Rekombinationsförderung und zur Hemmung von Polymerasen (zur Übersicht: Guntaka et al. 2003, a.a.o. S.26 f, Vasquez and Glaser 2002, a.a.o. S. 98 ff, jeweils mit weiteren Nachweisen).

Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, ein neuartiges Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches eine bessere Unterscheidung der methylierten Positionen erlaubt.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Hauptanspruchs gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den abhängigen Unteransprüchen gekennzeichnet.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA gelöst, wobei man die zu untersuchende DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt, das zwischen methylierter und nicht methylierter DNA unterscheidet.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass, das triplexbildende Molekül mit der zu untersuchenden DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist, und man die Triplexbildung zum Nachweis des Methylierungsstatus verwendet.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass man als triplexbildende Moleküle Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomere, andere Oligonukleotid-Analoga oder chimäre, von diesen Substanzklassen abgeleitete Moleküle verwendet.

Es ist ferner bevorzugt, dass das triplexbildende Molekül sowohl eine duplex- wie auch eine triplexbildende Sequenz trägt.

Es ist auch bevorzugt, dass das triplexbildende Molekül mindestens eine modifizierte Nukleobase trägt, die in der Triplex an ein Cytosin spezifisch oder selektiv bindet. Dabei ist weiterhin bevorzugt, dass man als Nukleobase N4-substituierte Cytosin-Derivate verwendet. Bevorzugt ist hierbei auch, dass man als Nukleobase N4-(3-Acetamidopropyl)cytosin oder N4-(6 Amino-2-pyridinyl)cytosin verwendet. Ganz besonders bevorzugt ist dabei, dass man als Nukleobase N4-substituierte Cytosine verwendet, die zusätzliche Modifikationen in der 3-Position tragen. Bevorzugt ist insbesondere auch, dass die 3-Position mit einem Methyl-, Ethyl- oder Isopropylrest modifiziert ist.

Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren, bei dem das triplexbildende Molekül eine nachweisbare Markierung trägt.

Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem der Nachweis des Methylierungsstatus über eine in situ-Hybridisierung erfolgt.

5 Weiterhin bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem zum Nachweis des Methylierungsstatus eine Amplifikation der DNA erfolgt, wobei durch die Triplexbildung die Amplifikation der methylierten DNA gegenüber der Amplifikation der unmethylierten DNA bevorzugt ist.

10

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem zum Nachweis des Methylierungsstatus eine Amplifikation der DNA erfolgt, wobei durch die Triplexbildung die Amplifikation der unmethylierten DNA gegenüber der Amplifikation der methylierten DNA bevorzugt ist.

15

Besonders bevorzugt ist es, dass triplexbildende Moleküle eingesetzt werden, die zugleich als Primer in der Amplifikation dienen.

20

Bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man durch die Triplexbildung Strukturen ausbildet, die eine Amplifikation behindern.

5

Dabei ist besonders bevorzugt, dass man bei der Amplifikation Desoxy-5-Methyl-Cytosintriphosphat, nicht aber Desoxy-Cytosintriphosphat (dCTP) einsetzt.

30

Weiterhin ist dabei bevorzugt, dass man zur Amplifikation eine Real-Time-PCR einsetzt.

Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren zur Trennung von methylierter und unmethylierter DNA, wobei

35

- a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt,
- b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex

bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

c) man die Triplexbildung zur Trennung ausnutzt.

5

Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren zur spezifischen Einführung von DNA-Schäden in unmethylierte DNA, wobei

a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt, das eine reaktive chemische Gruppe trägt,

10

b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

c) man die reaktive chemische Gruppe mit der in Triplexform vorliegenden DNA umsetzt.

15

Weiterhin ist erfindungsgemäß auch ein Verfahren zur spezifischen Inhibition der Replikation unmethylierter DNA, wobei

20

a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt,

b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

5

c) man die Replikation der in Triplexform vorliegenden DNA hemmt.

Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren zur spezifischen Inhibition der Transkription unmethylierter DNA, wobei

30

a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt,

b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

35

c) man die Transkription der in Triplexform vorliegenden DNA hemmt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Oligonukleotiden, Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomeren, anderen Oligonukleotid-Analoga oder chimären, von diesen Substanzklassen abgeleitete Molekülen, die N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin, N⁴-(6 Amino-2-pyridinyl)cytosin oder andere N⁴-substituierte Cytosin-Derivate enthalten, zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Demethylierung von Cytosinen assoziiert sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren benutzt zur Unterscheidung zwischen Methylcytosin und Cytosin die sterische Hinderung, die von der Methylgruppe des Methylcytosin ausgeht, und welche die Bindung bestimmter triplexbildender Oligomere behindern kann. Dabei spielen neben sterischen Gründen vermutlich auch elektronische Einflüsse der Methylgruppe eine Rolle. Als triplexbildende Oligomere können sowohl Oligonukleotide wie auch Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomere eingesetzt werden. Auch der Einsatz anderer Oligonukleotid-Analoga oder chimärer, von den oben genannten Substanzklassen abgeleiteter Moleküle ist möglich. Der Bindungscode für den dritten Strang und die bevorzugten Konditionen unter denen es zu einer Triplexbildung kommt, sind Stand der Technik (s.o., vgl. Nachweise bei US 6461810 B1 Sp.3 Zeilen 30ff). Für die Cytosin-Erkennung ist zu berücksichtigen, dass für die Triplexbildung grundsätzlich eine Wechselwirkung des dritten Strangs mit einer Homopurinsequenz erforderlich ist, es sich bei Cytosin aber um eine Pyrimidin-Base handelt. Für die Cytosin-Erkennung ist daher der Einsatz einer modifizierten Base erforderlich. Innerhalb paralleler Triplexe eignen sich insbesondere N⁴-substituierte Cytosin-Derivate mit Seitenketten, die Wasserstoffbrücken auch zu Guanin ausbilden und so die Triplex-Stabilität erhöhen.

Für eine Unterscheidung zwischen Cytosin und Methylcytosin ist es erforderlich, dass die modifizierten Basen so strukturiert sind, dass durch die 5-Methylgruppe des Cytosins eine Triplexbildung sterisch erschwert ist. Als modifizierte Basen besonders bevorzugt sind etwa N⁴-(3-Acetoamidopropyl)-cytosin und N⁴-(6 Amino-2-pyridinyl)-cytosin. Die Herstellung dieser Basen ist Stand der Technik (zur Übersicht: Gowers and Fox 1999, a.a.o., S. 1573 mit weiteren Nachweisen). Es ist zu erwarten, dass die sterische Hinderung und damit die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Cytosin und Methylcytosin weiter verstärkt wird, wenn die einge-setzten N⁴-substituierten Cytosin-Derivate zusätzliche Modifikationen an der 3-Position tragen, etwa Methyl-, Ethyl- oder Isopropyl-substituenten.

Zum Stand der Technik gehören auch eine Vielzahl von weiteren Modifikationen an den Zuckern und am Rückgrat der Nukleotide, die zu einer Triplexstabilisierung genutzt werden können. So werden insbesondere Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomere verwendet (zur Übersicht: Guntaka et al. 2003, a.a.o. mit weiteren Nachweisen). Es ist außerdem bekannt, dass die Triplex-Bildung durch Interkalatoren oder Triplex-spezifische Liganden stabilisiert werden kann (zur Übersicht: Sun: New targets for triple helix forming oligonucleotides. S. 273 ff, 276; Escude and Garestier: Triple helix stabilizing agents. S.257 ff, jeweils in: C. Malvy, A. Harel-Bellan, LL Pritchard, eds: Triple helix-forming oligonucleotides. Kluwer academic publishers 1999).

Die zu untersuchende DNA kann sowohl einzel- wie auch doppelsträngig vorliegen. Bei doppelsträngiger DNA werden als triplexbildende Moleküle bevorzugt Oligonukleotide einge-setzt. Geht man von einzelsträngiger DNA aus, so muss der Triplex- zunächst eine Duplex-Bildung vorausge-

hen. Beide Schritte können durch dasselbe Molekül vermittelt werden, wenn dieses eine der Ziel-DNA komplementäre Sequenz trägt und zudem über eine triplexbildende Domäne verfügt. Hierbei ist es besonders bevorzugt, PNA-Moleküle („bis-PNA“) einzusetzen, da PNA2-DNA-Triplexe besonders stabil sind (zur Übersicht: Ray and Norden 2000, a.a.o. S 1048). Die Orientierung des Watson-Crick-PNA-Strangs ist dabei antiparallel zur DNA, die Orientierung des Hoogsteen-Strangs parallel zur DNA. Beide Sequenzen sind über einen flexiblen Linker miteinander verknüpft. Angaben über Art und Länge des Linkers sind etwa in US 5693773 (Sp. 7 Zeilen 64 ff) beschrieben. Zur Bildung paralleler Triplexe ist eine Protonierung der Cytosine im dritten Strang erforderlich. Diese pH-Abhängigkeit kann jedoch umgangen werden, wenn die Cytosine durch Pseudoisocytosine (J) ersetzt werden. Die triplexbildenden PNA-Moleküle enthalten dann in der Watson-Crick-Sequenz Cytosin und in der Hoogsteen-Sequenz Pseudoisocytosin. Bis-PNA-Moleküle können auch zur Untersuchung doppelsträngiger DNA eingesetzt werden. Dabei verdrängt der duplexbildende Strang der PNA den entsprechenden DNA-Doppelstrang (Vgl.: Bentin and Nielsen: Triplexes involving PNA, in: C. Malvy, A. Harel-Bellan, LL Pritchard, eds: Triple helix-forming oligonucleotides. Kluwer academic publishers 1999, S. 245 ff mit weiteren Nachweisen).

Die methylierungsabhängige Triplexbildung lässt sich auf unterschiedliche Weise detektieren. So ist es erfindungsgemäß, das triplexbildende Molekül zu markieren und dann die Triplex, also den nicht-methylierten Status, nachzuweisen. Eine bevorzugte Ausführungsform dieses Verfahrens ist die *in situ* Hybridisierung. Hiermit kann etwa in Zellen unmethylierte doppelsträngige DNA nachgewiesen werden. Die Sequenzspezifität des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dabei ein besonderer Vorteil gegenüber anderen bekannten Methoden zur *in situ* Detektion von Cytosin-

Methylierungen, etwa über methylierungsspezifische Antikörper.

Als triplexbildende Moleküle können insbesondere chemisch modifizierte Oligonukleotide dienen (s.o.). Die Oligonukleotide sind zwischen 7 und 50 Nukleotide, bevorzugt zwischen 10 und 30 Nukleotide lang. Sie tragen Reportermoleküle, die mit chemischen oder physikalischen Methoden detektiert werden können, etwa Biotin-, Fluoreszenz- oder radioaktive Markierungen. Die exakten Bedingungen für eine *in situ*-Hybridisierung unter Triplex-Bildung sind Stand der Technik (US 6461810 B1, insbesondere Sp. 3 ff).

In einer anderen erfindungsgemäßen Variante erfolgt die Detektion einer Methylierung über eine Amplifikation der methylierten DNA, während gleichzeitig die Amplifikation unmethylierter DNA durch die Triplexstruktur blockiert wird. Zur Amplifikation können die gängigen Verfahren, etwa die PCR, benutzt werden. Dabei erfolgt die Primerbindung unabhängig vom Methylierungsstatus, aber die Verlängerung der Primer wird durch die Triplexbildung an bestimmten Stellen blockiert. Es ist bekannt, dass DNA-Polymerasen nicht in der Lage sind, Triplex-Strukturen aufzulösen. Die Polymerisation kommt daher an diesen Stellen zum Erliegen (WO 96/18732, insbesondere S. 18, Zeile 17 ff). Wegen der besonderen Stabilität der Triplex ist es bevorzugt, zur Blockierung die oben erwähnten bis-PNA-Moleküle zu verwenden, die sowohl duplex- wie auch triplexbildende Sequenzen tragen. Natürlich können auch zwei unterschiedliche Moleküle oder Oligonukleotide eingesetzt werden. Auch ist es denkbar und bevorzugt, andere Oligonukleotid-Analoga zu verwenden, etwa LNA (Locked Nucleic Acids). Dem Fachmann sind Verfahren zur Herstellung der entsprechenden Oligonukleotid-Analoga bekannt (zur Übersicht: Braasch and Corey: Locked nucleic acid

(LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. Chem Biol 2001 Jan;8(1):1-7 mit weiteren Nachweisen).

Die Konzentration der Blockermoleküle muss so hoch sein, dass eine vollständige Blockierung gewährleistet ist. Bevorzugt ist dabei ein Konzentrationsbereich zwischen 100-1000 nM. Die Amplifikation der methylierten DNA erfolgt im übrigen nach dem Stand der Technik. Zu beachten ist allerdings, dass nur 5-Methyl-Cytosin-Nukleosidtriphosphate eingesetzt werden dürfen. Würde in die neu synthetisierten DNA-Stränge Cytosin eingebaut, so würden die Triplex-bildenden Moleküle nicht nur an die ursprünglich unmethylierte DNA binden, sondern auch an die neuen, aus der ursprünglich methylierten DNA hergestellten Moleküle. Die Amplifikate können auf unterschiedliche, dem Fachmann bekannte Arten detektiert werden, etwa über Methoden der Längenmessung wie Gelelektrophorese, Kapillarelektrophorese und Chromatographie (z.B. HPLC). Auch Real-Time-Varianten können eingesetzt werden, etwa das Tag-man- oder das Lightcycler-Verfahren.

Eine andere erfindungsgemäße Ausführungsform zur selektiven Amplifikation der methylierten DNA liegt darin, Primer einzusetzen, die gleichzeitig über eine triplexbildende Domäne verfügen. Bevorzugt setzt man hierzu Oligonukleotide ein. Die Watson-Crick-bildende Sequenz liegt dabei am 3'-Ende des Primers, die Hoogsteen-bildende Sequenz am 5'-Ende. Beide Teile sind wie oben beschrieben über einen Linker verbunden. Die Primer sind zwischen 30 und 80 Nukleotide lang, bevorzugt verfügen sie über 40-60 Nukleotide. Eine Amplifikation kann nur dann erfolgen, wenn der Primer keine Triplex bildet, also wenn die entsprechende Cytosin-Position methyliert vorliegt. Bei der Amplifikation ist wiederum auf den Einsatz von methyliertem Desoxyxycytosintriphosphat zu achten. Die Detektion der

Amplifikate kann wie oben beschrieben erfolgen. Erfindungsgemäß ist auch die umgekehrte Variante, bei der die Primer so konstruiert sind, dass eine Verlängerung nur dann erfolgt, wenn eine Triplex gebildet wird, also wenn Cytosin in der unmethylierten Form vorliegt.

Neben dem Nachweis methylierter DNA kann das erfindungsgemäße Verfahren auch genutzt werden, um methylierte Sequenzen von unmethylierten zu trennen. Dabei wird

- a) die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt gebracht,
- b) das triplexbildende Molekül bildet mit der DNA eine Triplex, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist, und
- c) die Triplexbildung wird zur Trennung ausgenutzt.

Eine bevorzugte Möglichkeit hierzu ist die in der Literatur beschriebene Triple Helix-Affinitätschromatographie (vgl.: Kamenetskii: Triplexes and biotechnology. In: C. Malvy, A. Harel-Bellan, LL Pritchard, eds: Triple helix-forming oligonucleotides. Kluwer academic publishers 1999, 285, 287 f mit weiteren Nachweisen).

Auch für weitere Anwendungen kann die methylierungsspezifische Triplexbildung genutzt werden. Eine erfindungsgemäße Möglichkeit ist die sequenzspezifische Einführung von DNA-Schäden in unmethylierte DNA. Dabei wird

- a) die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt gebracht, das eine reaktive chemische Gruppe trägt,
- b) das triplexbildende Molekül bildet mit der DNA eine Triplex, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,
- c) die reaktive chemische Gruppe reagiert mit der in Triplexform vorliegenden DNA.

Als reaktive chemische Gruppen kommen insbesondere Psoralen oder alkylierende Reagenzien in Betracht. Die genauen Bedingungen vergleichbarer Verfahren sind in der Literatur beschrieben (zur Übersicht: Faria and Giovannangeli, Triplex-forming molecules: from concepts to applications. J Gene Med. 2001 Jul-Aug;3(4):299-310 mit weiteren Nachweisen)

Andere erfindungsgemäße Anwendungen sind die Transkriptionsmodulation, die Replikationsinhibition, die ortsgerichteten Mutagenese und die Rekombinationsförderung bestimmter unmethylierter DNA-Sequenzen. Dabei wird

a) die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt gebracht,

b) das triplexbildende Molekül bildet mit der DNA eine Triplex, wobei die Triplexbildung mit unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung mit methylierter DNA bevorzugt ist und

c) die Replikation bzw. die Transkription der in Triplexform vorliegenden DNA wird gehemmt, bzw. es erfolgt eine Förderung von Mutationen oder Rekombinationen.

Die genauen Bedingungen vergleichbarer Verfahren sind in der Literatur beschrieben (zur Übersicht: Faria and Giovannangeli, Triplex-forming molecules: from concepts to applications. J Gene Med. 2001 Jul-Aug;3(4):299-310 mit weiteren Nachweisen).

Erfindungsgemäß ist es auch, die oben genannten Verfahren therapeutisch anzuwenden. Es ist bekannt, dass viele Krankheiten mit einer Cytosin-Demethylierung von Promotorregionen oder anderen regulatorischen Bereichen bestimmter Gene verbunden sind. Durch diese Demethylierung kommt es zu einer Transkriptionsaktivierung. Die Applikation triplexbildender Moleküle erlaubt eine sequenzspezi-

fische Transkriptions- oder Replikationsinhibierung bzw. eine gezielte Schädigung der entsprechenden Sequenzen. Als mögliche Therapeutika kommen insbesondere Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomere, anderen Oligonukleotid-Analoga oder chimäre, von diesen Substanzklassen abgeleitete Moleküle in Betracht, die N⁴-substituierte Cytosin-Derivate enthalten, etwa N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin oder N⁴-(6 Amino-2-pyridinyl)cytosin. Dabei können die Oligomere zusammen mit einem pharmazeutischen Träger und eventuell mit weiteren Hilfsstoffen über unterschiedliche Wege verabreicht werden. Auch eine Kombination mit anderen therapeutischen Agenzien ist möglich. Die genaue Zusammensetzung und die Art der Verabreichung vermag der Fachmann nach den konventionellen pharmazeutischen Prinzipien zu bestimmen.

Kurze Beschreibung der Figuren.

Figur 1 zeigt N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem C-G-Paar. Die Abbildung ist aus Gowers and Fox 1999, a.a.o entnommen.

Figur zeigt N⁴-(6 Amino-2-pyridinyl)cytosin und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem C-G-Paar. Die Abbildung ist aus Gowers and Fox 1999, a.a.o entnommen.

BEISPIELE

Beispiel 1:

Nachweis von Cytosin-Methylierungen durch Einsatz von Bis-PNA-Molekülen

Die in der nachfolgenden DNA-Sequenz unterstrichen dargestellten Cytosine sollen in ihrem methylierten, nicht je-

doch in ihrem unmethylierten Zustand nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt durch eine PCR, bei der die dargestellte Sequenz beim Vorliegen dieser Methylierung, nicht jedoch bei deren Nichtvorliegen, amplifiziert wird.

5'-

CGGAGGAAGAAAGAGGAGGGGCTGGCTGGTCACCAGAGGGTGGGGCG-
GACCGCGTGCGCTCGGCGGCTGCGGAGAGGGGGAGAGCAGG-
CAGCGGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCTT-
3' (SEQ ID: 1)

Dazu wird isolierte und gereinigte DNA unter Verwendung der Primer CGGAGGAAGA-AAGAGGAG und AAGGCTCCATGCTGCTC (beide in einer Konzentration von jeweils 300nM) in Gegenwart von 100nM des Bis-PNA-Moleküls NH₂-CTCCCCGCCGC-0-0-0-JXJJXJJJJTJ-COOH (X = N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin; O = 8-Amino-3,6-dioxaoktansäure; J = Pseudoisocytosin) in einem Reaktionsvolumen von 0,02ml einer PCR unterworfen (55°C Annealingtemperatur, 72°C Primerverlängerungstemperatur, 95°C Denaturierungstemperatur, 42 Reaktionszyklen). Anstelle von Cytosin-Desoxy-Nukleosidtriphosphat wird 5-Methyl-desoxy-cytosintriphosphat eingesetzt. Der Nachweis des Amplifikats mit einer Länge von 143 Basenpaaren erfolgt nach Auftrennung des PCR-Produkts durch Agarosegelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid durch Sichtbarmachung im ultravioletten Licht.

Die Synthese des modifizierten Cytosins erfolgt wie in der Literatur beschrieben (zur Übersicht: Gowers and Fox 1999, a.a.o. S. 1573 mit weiteren Nachweisen). Die Synthese der PNA-Moleküle ist ebenfalls Stand der Technik (siehe etwa Nachweise bei Ray and Norden 2000, a.a.o. S. 1042).

Beispiel 2:

Nachweis von Cytosin-Methylierungen durch Einsatz von PNA-DNA-Hybridmolekülen

Die in der nachfolgenden DNA-Sequenz unterstrichen dargestellten Cytosine sollen in ihrem methylierten, nicht jedoch in ihrem unmethylierten Zustand nachgewiesen werden.

5 Der Nachweis erfolgt durch eine PCR, bei der die dargestellte Sequenz beim Vorliegen dieser Methylierung, nicht jedoch bei deren Nichtvorliegen, amplifiziert wird. Dazu wird ein PCR-Primer mit einer PNA-Domäne so modifiziert, dass bei Nichtvorliegen der Methylierung, nicht jedoch
10 bei Vorliegen, eine Triplexstruktur ausgebildet wird, welche die Bindung der DNA-Polymerase und damit die Amplifikation verhindert.

5'-CGGAGGAAGAAAGAGGAGGGGCTGGCTGGTCACCAGAGGGTGGGG-
15 CGGACCGCGTGCCTCGGCGGCTGCGGAGAGGGGGAGAGCAGG-
CAGCGGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCGGCGGCGGGGAGCA-3'
(SEQ. ID: 2)

Isolierte und gereinigte DNA wird unter Verwendung des
20 Primers CGGAGGAAGAAA-GAGGAG und des PNA-DNA-Hybridmoleküls (beide 300nm) NH₂-XJJXJJXJJJJTJ-O-O-O-O-
(T)GCTCCCCGCCGCCG-3' (DNA-Monomere kursiv; X = N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin; O = 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure; J = Pseudoisocytosin; (T) = 5'-Aminothymidin) in einem
25 Reaktionsvolumen von 0,02ml einer PCR unterworfen (55°C An-nealingtemperatur, 72°C Primerverlängerungstemperatur, 95°C Denaturierungstemperatur, 42 Reaktionszyklen). Als Cytosin-Desoxy-Nukleosidtriphosphat wird 5'-Methyl-Desoxy-Cytosintriphosphat eingesetzt. Der Nachweis des Amplifikates mit einer Länge von 143 Basenpaaren erfolgt nach
30 Auftrennung des PCR-Produkts durch Agarosegelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid durch Sichtbarmachung im ultravioletten Licht.

Die Synthese von PNA-DNA-Hybridmolekülen ist Stand der Technik (siehe etwa bei Uhlmann et al. Angew. Chem. 1998, 110, 2954-83 und darin enthaltene Nachweise)

- 5 Beispiel 3:
Methylierungsspezifische Markierung von DNA durch Einsatz biotinylierter Bis-PNA-Moleküle

10 Die nachfolgende Sequenz soll im Bereich der beiden unterstrichenen Cytosine durch Bindung einer Bis-PNA nur dann mit einem Biotinrest markiert werden, wenn diese Cytosine in ihrer unmethylierten, nicht jedoch, wenn sie in ihrer methylierten Form vorliegen.

15 5'-
CGGAGGAAGAAAGAGGAGGGGCTGGCTGGTCACCAGAGGGTGGGGCG-
GACCGCGTGCCTCGGCGGCTGCGGAGAGGGGAGAGCAGG-
CAGCGGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCTT-
3' (SEQ ID 3)

20 Dazu wird isolierte und gereinigte DNA mit 100nM Biotinyl-NH-CTCCCCGCCGC-0-0-0-JXJJXJJJTJ-COOH (X = N4-(3-Acetamidopropyl)cytosin; 0 = 8-Amino-3,6-dioxaoktansäure; J = Pseudoisocytosin) in 100mM Phosphatpuffer (pH 7-8, 500mM NaCl) gelöst und nach zehnminütiger Denaturierung bei 95°C für drei Stunden bei 55°C inkubiert. Nach Abtrennung überschüssiger bis-PNA, beispielsweise durch
25 Ultrafiltration oder Gelfiltration, steht die markierte DNA für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

30

Sequenzprotokoll

<110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-
Sequenzen mittels triplexbildender Oligomere

<160> 3

<210> 1

<211> 143

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

cggaggaaga aagaggaggg gctggctggt caccagaggg tggggcggac cgcgtgcgct
cggcggctgc ggagaggggg agagcaggca gcgggcggcg gggagcagca tggagccggc
ggcggggagc agcatggagc ctt

<210> 2

<211> 131

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

cggaggaaga aagaggaggg gctggctggt caccagaggg tggggcggac cgcgtgcgct
cggcggctgc ggagaggggg agagcaggca gcgggcggcg gggagcagca tggagccggc
ggcggggagc a

<210> 3

<211> 143

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 3

cggaggaaga aagaggaggg gctggctggt caccagaggg tggggcggac cgcgtgcgct
cggcggctgc ggagaggggg agagcaggca gcgggcggcg gggagcagca tggagccggc
ggcggggagc agcatggagc ctt

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA, dadurch gekennzeichnet, dass man die zu untersuchende DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt, das zwischen methylierter und nicht methylierter DNA unterscheidet.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass, das triplexbildende Molekül mit der zu untersuchenden DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist, und man
15 die Triplexbildung zum Nachweis des Methylierungsstatus verwendet.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als triplexbildende Moleküle Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomere, andere Oligonukleotid-Analoga oder chimäre, von diesen Substanzklassen abgeleitete Moleküle verwendet.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das triplexbildende Molekül sowohl eine duplex- wie auch eine triplexbildende Sequenz trägt.
- 30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das triplexbildende Molekül mindestens eine modifizierte Nukleobase trägt, die in der Triplex an ein Cytosin spezifisch oder selektiv bindet.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleobase N⁴-substituierte Cytosin-Derivate verwendet.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleobase N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin oder N⁴-(6 Amino-2-pyridinyl)cytosin verwendet.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleobase N⁴-substituierte Cytosine verwendet, die zusätzliche Modifikationen in der 3-Position tragen.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die 3-Position mit einem Methyl-, Ethyl- oder Isopropylrest modifiziert ist.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das triplexbildende Molekül eine nachweisbare Markierung trägt.
- 25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis des Methylierungsstatus über eine *in situ*-Hybridisierung erfolgt.
- 30 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis des Methylierungsstatus eine Amplifikation der DNA erfolgt, wobei durch die Triplexbildung die Amplifikation der methylierten DNA gegenüber der Amplifikation der unmethylierten DNA bevorzugt ist.
- 35 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis des Methylierungsstatus eine Amplifikation der DNA erfolgt, wobei

durch die Triplexbildung die Amplifikation der unmethylierten DNA gegenüber der Amplifikation der methylierten DNA bevorzugt ist.

- 5 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass triplexbildende Moleküle eingesetzt werden, die zugleich als Primer in der Amplifikation dienen.
- 10 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass man durch die Triplexbildung Strukturen ausbildet, die eine Amplifikation behindern.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man bei der Amplifikation Desoxy-5-Methyl-Cytosintriphosphat, nicht aber Desoxy-Cytosintriphosphat (dCTP) einsetzt.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Amplifikation eine Real-Time-PCR einsetzt.
- 25 18. Verfahren zur Trennung von methylierter und unmethylierter DNA, dadurch gekennzeichnet, dass
- 30 a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt,
- b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,
- 35 c) man die Triplexbildung zur Trennung ausnutzt.
19. Verfahren zur spezifischen Einführung von DNA-Schäden in unmethylierte DNA, dadurch gekennzeichnet, dass
- a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in

Kontakt bringt, das eine reaktive chemische Gruppe trägt,

b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

c) man die reaktive chemische Gruppe mit der in Triplexform vorliegenden DNA umsetzt.

20. Verfahren zur spezifischen Inhibition der Replikation unmethylierter DNA, dadurch gekennzeichnet, dass

a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt,

b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

c) man die Replikation der in Triplexform vorliegenden DNA hemmt.

21. Verfahren zur spezifischen Inhibition der Transkription unmethylierter DNA, dadurch gekennzeichnet, dass

a) man die DNA mit einem triplexbildenden Molekül in Kontakt bringt,

b) das triplexbildende Molekül mit der DNA eine Triplex bildet, wobei die Triplexbildung bei unmethylierter DNA gegenüber der Triplexbildung bei methylierter DNA bevorzugt ist,

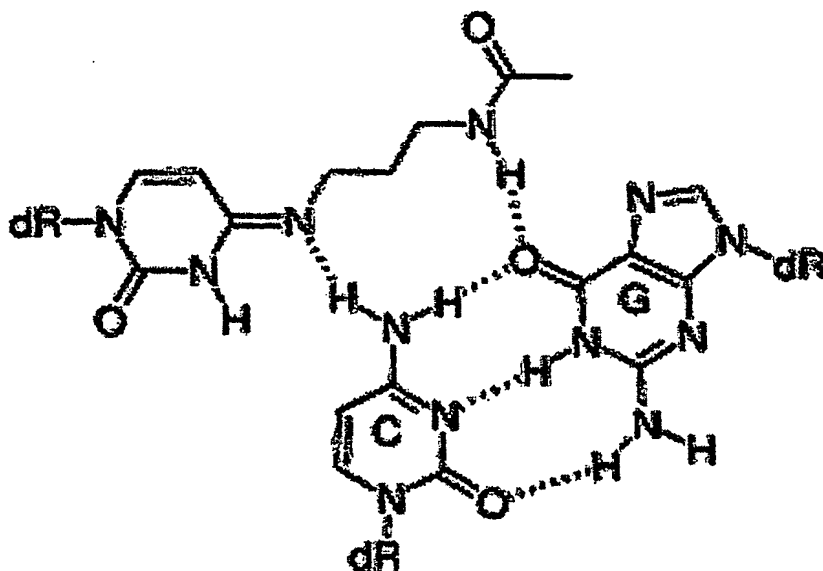
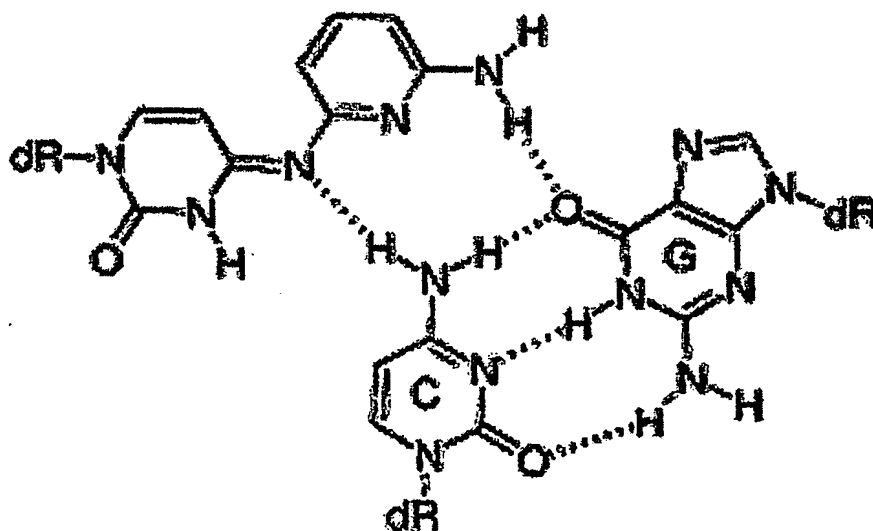
c) man die Transkription der in Triplexform vorliegenden DNA hemmt.

22. Verwendung von Oligonukleotiden, Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligomeren, anderen Oligonukleotid-Analoga oder chimären, von diesen Substanzklassen abgeleitete Molekülen, die N⁴-(3-Acetamidopropyl)cytosin , N⁴-(6-Amino-2-pyridinyl)cytosin oder andere N⁴-

substituierte Cytosin-Derivate enthalten, zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Demethylierung von Cytosinen assoziiert sind.

Zusammenfassung

5 Es wird ein Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-
Methylierungen in DNA-Sequenzen beschrieben. Es werden
triplexbildende Oligomere eingesetzt, die bevorzugt an
den Positionen Triplex-Strukturen ausbilden, an denen Cy-
tosin in der Position 5 unmethyliert vorliegt. Die
10 Triplexe blockieren die Transkription, Replikation und
Amplifikation der DNA. Als triplexbildende Oligomere kön-
nen insbesondere Peptid-Nukleinsäure-Oligomere mit modi-
fizierten Nukleobasen verwendet werden.

Fig. 15 **Fig. 2**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.